



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 23 439 A 1**

⑤① Int. Cl.7:
G 02 B 21/16

⑳ Aktenzeichen: 101 23 439.2
㉑ Anmeldetag: 14. 5. 2001
㉒ Offenlegungstag: 21. 11. 2002

DE 101 23 439 A 1

㉑ Anmelder:
Trier, Bernhard, Dipl.-Ing., 73447 Oberkochen, DE
㉒ Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Pfister & Pfister, 87700
Memmingen

㉑ Erfinder:
Geis, Walter, Dr., 73431 Aalen, DE; Trier, Bernhard,
73447 Oberkochen, DE

⑤② Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 199 06 757 A1
DE 693 20 484 T2
DD 2 10 985

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤③ Fluoreszenzmikroskop

⑤④ Die Erfindung betrifft ein Fluoreszenzmikroskop. Dieses besteht aus einer Anregungslichtquelle, deren Strahlung auf eine Probe gerichtet ist. Das Fluoreszenzspektrum der Probe ist über ein Okular abbildbar. Als Anregungslichtquelle dient ein Laser.

DE 101 23 439 A 1

DE 101 23 439 A 1

1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Fluoreszenzmikroskop, bestehend aus einer Anregungslichtquelle, deren Strahlung auf eine Probe gerichtet ist, dessen Fluoreszenzspektrum über ein Okular abbildbar ist.

[0002] Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gewinnen zunehmend an Bedeutung auf dem Gebiet der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung-Mikroskopie (FISH-Mikroskopie). Sie dienen zur Lokalisierung von DNA- und RNA-Sequenzen in biologischem Material, zum Beispiel in Chromosomen, Zellen oder Gewebe. Sie wird eingesetzt im Karyotyping, in der pränatalen Diagnostik. Sie dienen zum Nachweis diagnostisch wichtiger Aneuploidien, zum Beispiel Trisomie 21.

[0003] Im Stand der Technik ist bekannt, die Anregung der Fluoreszenz vorzugsweise mit der Strahlung von Quecksilberhochdrucklampen zu verwenden. Hierbei werden Einfach- oder Mehrfachfiltersätze eingesetzt. Die Filter dienen dazu, eine oder mehrere Quecksilberlinien oder auch Kontinuumsstrahlung aus dem Lampenspektrum zu selektieren. Die Strahlung der Anregungslichtquelle wird auf die Probe gerichtet. Dies kann gegebenenfalls mit entsprechender Optik unterstützt werden. Die Moleküle der Probe werden durch die Strahlung in höhere Anregungszustände (Tenne) versetzt. Dabei wird die Linie der Strahlung auf den Fluoreszenzfarbstoff abgestimmt.

[0004] In der Regel erfolgt ein Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des Singlett-Grundzustandes S in die verschiedenen Schwingungszustände des ersten angeregten Singlett-Zustandes S'. Nach der Lichtanregung fallen die Moleküle durch strahlungslose Deaktivierung in den niedrigsten Schwingungszustand des angeregten Zustandes S' zurück, von welchem sie dann durch Lichtemission in die verschiedenen Schwingungszustände des Grundzustandes S zurückfallen, unter Emission eines Photons. Es ergibt sich dabei, daß das Emissionsspektrum, also das Fluoreszenzspektrum der Probe, gemäß der Stokesschen Regeln, zu langwelligeren Strahlung hin verschoben ist.

[0005] Die Steilheit der in dem Strahlengang des Lichtes der Quecksilberhochdrucklampe aufgestellten Anregungsfilters ist nicht beliebig groß, gleichzeitig ist es notwendig, daß in dem Strahlengang des Fluoreszenzspektrums (dies beschreibt nachfolgend die Strahlung der fluoreszierenden Probe) ebenfalls zur Abtrennung des Anregungslichtes ein entsprechend steiler Emissionsfilter vorgesehen wird. Dabei ist zu beachten, daß das Verhältnis der Intensitäten der Anregungsstrahlung und der emittierten Strahlung mehrere Zehnerpotenzen Abstand beträgt, weswegen der Einsatz von Filtern für eine Beobachtung unumgänglich ist. Nun ergibt es sich aber, daß die langwellige Verschiebung der Fluoreszenz innerhalb von ca. 10 bis 30 nm der Wellenlänge liegt, was genau die Spanne der endlichen Steilheit der eingesetzten Filter ist, weswegen gerade im effizientesten Bereich der Anregung der Fluoreszenz eine optimale Mikroskopierung nicht möglich ist.

[0006] Die vorliegende Erfindung hat es sich zur Aufgabe gemacht, die vorbeschriebenen Nachteile zu vermeiden.

[0007] Zur Lösung dieser Aufgabe geht die Erfindung aus von einem Fluoreszenzmikroskop wie eingangs beschrieben und schlägt vor, daß als Anregungslichtquelle ein Laser vorgesehen ist.

[0008] Durch die erfindungsgemäße Ausbildung wird erreicht, daß auf den Einsatz des Anregungsfilters mit endlicher Steilheit verzichtet werden kann. Hieraus resultiert, daß in dem interessierenden Wellenlängenbereich ein die beobachtbare Intensität schmälernendes Filterelement eingespart wird, wodurch mehr Intensität auf die Probe gelangen kann

2

und daher auch das Fluoreszenzspektrum intensiver wird. [0009] Bekanntlich emittieren Laser Licht von großer Intensität bei einer Wellenlänge mit sehr enger Bandbreite. Um das erfindungsgemäße Prinzip auch bei einer Vielzahl unterschiedlich zu beobachtender Proben einzusetzen, wird in einer erfindungsgemäßen Weiterentwicklung vorgeschlagen, daß als Anregungslichtquelle mehrere Laser bei verschiedenen Wellenlängen eingesetzt werden. In der Regel sind dabei die verwendeten Wellenlängen entsprechend den zu beobachtenden Fluoreszenzspektren angepaßt, wobei aus der großen Vielzahl der unterschiedlichen Lasertypen und auch bei den bekannten Verfahren zur Veränderung (Frequenzverdopplung, Frequenzvervielfachung) der Laserstrahlungen entsprechende Wellenlängen erzeugt und zur Verfügung gestellt werden können.

[0010] Soweit es möglich ist, dies hängt von den jeweiligen Laserfarbstoffen beziehungsweise lasernden Materialien ab, können mehrere Laserlinien in ein und demselben LasermEDIUM angeregt werden, was aber nur bei wenigen Farbstoffen möglich ist. In der Regel wird es günstig sein, eine Anzahl von Lasern nebeneinander anzuordnen und eine entsprechende Strahlzusammenführungsoptik vorzusehen, die die Strahlung der unterschiedlichen Laser zusammenkoppelt zu einem Bündel von Strahlen diskreter Wellenlängen.

[0011] In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, daß in dem optischen Weg ein Lichtfeldaufweitungssystem zur möglichst vollständigen Ausleuchtung des Sehfeldes vorgesehen ist. Der optische Weg ist dabei im Wesentlichen definiert als Abstand zwischen dem Ort der Anregungslichtquelle und der Probe, wobei in diesem Weg übliche optische Bauelemente wie Linsen, Spiegel und so weiter angeordnet werden können. Durch den Einsatz von Linsen und gegebenenfalls die Verwendung von Leuchtfeldblenden ist es möglich, eine möglichst vollständige Ausleuchtung des Sehfeldes zu erreichen, wodurch das Mikroskopieren erleichtert wird.

[0012] In der Regel ist der Aufbau des Mikroskopes so gewählt, daß der Strahlengang der Strahlung der Anregungslichtquelle im Bereich der Probe parallel zum Strahlengang des Fluoreszenzspektrums ist. Durch einen geeignet ausgebildeten Einkoppler, zum Beispiel einen Farberteiler oder einen entsprechend durchlässigen Spiegel, werden diese beiden Strahlengänge voneinander getrennt zusammengeführt. Um zu vermeiden, daß in diesem Bereich doch Anteile der Anregungslichtquelle auf das Okular gerichtet werden, wird vorgeschlagen, daß insbesondere in Strahlrichtung des Fluoreszenzspektrums nach dem Farberteiler, zwischen Probe und Okular, ein Emissionsfilter vorgesehen ist. Hierauf ist der Einsatz des Emissionsfilters aber nicht beschränkt, es ist durchaus auch möglich, auf den Einsatz eines Farberteiles zu verzichten, nämlich dann, wenn die Probe von einer Richtung her beleuchtet wird und das Fluoreszenzspektrum mit einem Winkel zu dieser Richtung beobachtet wird. Dabei ist insbesondere zu beachten, daß die Intensität der Anregungslichtquelle mehrere Größenordnungen höher ist als die Intensität des Fluoreszenzspektrums. [0013] Zur Entkopplung des Strahlenganges der Anregungslichtquelle und des Fluoreszenzspektrums wird vorgeschlagen, daß ein Farberteiler vorgesehen ist. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzspektrum durchdringt den Farberteiler in Richtung des Okulars. Der Farberteiler ist dabei zum Beispiel als dichroitischer Farberteiler ausgebildet und hat die Eigenschaft, daß er die Anregungsstrahlung auf die Probe reflektiert beziehungsweise umlenkt, wenn der Farberteiler unter einem gewissen Winkel zum Strahlengang angeordnet ist und die Emissionsstrahlung, also das Fluoreszenzspektrum der Probe, transmittiert.

DE 101 23 439 A 1

3

4

[0014] Durch die Verwendung von dichroitischen Filtern ist es prinzipiell möglich, verhältnismäßig scharf trennende optische Filterelemente zu realisieren.

[0015] Bevorzugt wird die Strahlung des Lasers durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Insbesondere wenn ein Lichtfeldaufweitungssystem vorgesehen ist, kann durch diese Ausgestaltung eine möglichst homogene, großflächige Ausleuchtung des Sehfeldes für das Fluoreszenzspektrum erreicht werden.

[0016] Erfindungsgemäß wird als Anregungslichtquelle der Einsatz eines Lasers vorgeschlagen. Wie bereits ausgeführt, können an dieser Stelle alle bekannten Lasertypen eingesetzt werden, wobei der Einsatz von Festkörperlasern, Gaslasern oder Laserdioden möglich ist, wobei aber auch laserdiodengepumpte Festkörperlaser verwendbar sind. Des weiteren ist es möglich, Lasersysteme mit Frequenzverdopplung beziehungsweise Frequenzvervielfachung oder gemischter Frequenzvervielfachung, insbesondere laserdiodengepumpte Festkörperlaser mit entsprechender Frequenzvervielfachung, einzusetzen. Auch ist die Verwendung von freien Elektronenlasern (Free-Elektron-Laser) vorstellbar, die den Vorteil bieten, daß eine Abstimmbarekeit der Wellenlänge des Lasers in einem weiten Bereich möglich ist.

[0017] Gerade bei der Anordnung von mehreren Lasern nebeneinander ist es von Vorteil, daß die Intensität der Laser veränderlich und einstellbar ist. Gerade wenn bei einer ersten Wellenlänge für den Fluoreszenzfarbstoff der ersten Probe eine Mikroskopierung durchzuführen ist, ist es günstig, die Intensität der Laserquelle der zweiten Wellenlänge entsprechend zu reduzieren, um nicht entsprechende unerwünschte Anregungen im Fluoreszenzspektrum zu erzeugen. Je nach zu untersuchendem Material kann aber die Mischung der Wellenlängen günstig sein, wodurch sich durch die Einstellbarkeit der Intensität der Anregungslichtquelle mannigfache Möglichkeiten für den Bediener des Mikroskopes ergeben.

[0018] Neben der Veränderbarkeit der Intensität der Laserstrahlung ist es aber auch günstig, wenn, soweit realisierbar, auch die Wellenlänge des Laserlichtes der Anregungslichtquelle veränderlich und einstellbar ist. Zum einen können bei ein und demselben Festkörperlaser (zum Beispiel Helium-Neon-Laser) verschiedene Laserübergänge angeregt werden, die zum Beispiel durch eine Veränderung des Resonatorraumes induziert wird. Bei einem Free-Elektron-Laser kann durch eine Änderung der Radian der Elektronen eine Abstimmung der emittierten Strahlung erreicht werden, oder aber es wird der Abstrahlwinkel entsprechend verändert.

[0019] In der Zeichnung ist die Erfindung schematisch dargestellt. Es zeigen:

[0020] Fig. 1 in einer Draufsicht eine Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Fluoreszenzmikroskopes;

[0021] Fig. 2 und 3 ebenfalls in Draufsicht verschiedene Varianten der Anregungslichtquelle des erfindungsgemäßen Fluoreszenzmikroskopes und

[0022] Fig. 4 ebenfalls in Draufsicht eine weitere Variante des erfindungsgemäßen Fluoreszenzmikroskopes.

[0023] Der Aufbau des erfindungsgemäßen Fluoreszenzmikroskopes ist insbesondere in Fig. 1 gut erkennbar. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Fluoreszenzmikroskopes soll das Material der Probe 9 bestrahlt werden und dann das Fluoreszenzspektrum 9 über das Okular 8 beobachtet werden. Dies dient zum Beispiel für diagnostische Zwecke. Für das Beleuchten der Probe 9 ist eine Anregungslichtquelle 1 vorgesehen. Diese ist als Laser 10 ausgebildet. Die hierbei emittierte Strahlung 1' wird über die Linse 19 in ein Lichtfeldaufweitungssystem 5 eingekoppelt. Wie angedeutet, wird durch das Lichtfeldaufweitungssystem 5 die Strahl-

breite des Strahles 1' zum Strahl 1'' mehr als verdoppelt und damit aufgeweitet. Diese Aufweitung dient zu einer besseren Ausleuchtung des Sehfeldes.

[0024] Das Lichtfeldaufweitungssystem 5 besteht hierbei aus, wie hier dargestellt, zwei Linsen 50, 51 und einer dazwischen angeordneten Leuchtfeldblende 52. Für eine optimale Abbildung, insbesondere zur Vermeidung von entsprechenden Verlusten, ist vorgesehen, daß die optischen Elemente, nämlich die Linse 19 sowie die Linsen 50, 51 des Lichtfeldaufweitungssystems, beweglich gelagert sind, um eine optimale Einstellung zu ermöglichen.

[0025] Die Strahlung 1'' trifft nach dem Lichtfeldaufweitungssystem auf eine reflektierende Fläche. Diese ist zum Beispiel als Farbteiler 6 ausgebildet und steht in einem Winkel von zum Beispiel 45° zur Strahlrichtung 1''. Der Farbteiler 6 ist dabei als dichroitischer Farbteiler ausgebildet und erlaubt eine Reflexion der Anregungsstrahlung 1'' auf die Probe. Mit Hilfe des Farbteilers wird somit die von der Anregungslichtquelle 1 emittierte Strahlung in das optische System des eigentlichen Mikroskopes, aufgebaut aus dem Objektiv 7 und dem Okular 8, eingekoppelt.

[0026] Die an dem Farbteiler 6 reflektierte Strahlung 1'' wird dann über das Objektiv auf die Probe 9 fokussiert, wobei hierbei die Anregungsstrahlung 1'' den zu untersuchenden Farbstoff der Probe 9 entsprechend anregt.

[0027] Die von der Probe 9 abgegebene Strahlung des Fluoreszenzspektrums 9' wird von dem Objektiv 7 aufgenommen und in Richtung auf das Okular 8 abgebildet. Wie ausgeführt, ist die Fluoreszenz zu längeren Wellen verschoben, wobei der Farbteiler 6 so abgestimmt ist, daß er die Emissionsstrahlung 9' (also das Fluoreszenzspektrum) durchläßt, also transmittieren läßt und nicht ablenkt, wie die Anregungsstrahlung 1''. Im Strahlengang der Strahlung 9' (des Fluoreszenzspektrums) ist ein Emissionsfilter 60 vorgesehen, der die Anregungsstrahlung vollständig blockt. Wie in Fig. 1 angedeutet, kann der Emissionsfilter 60 in dem Strahlenweg nach dem Farbteiler 6 angeordnet sein. In einer anderen erfindungsgemäßen Ausgestaltung ist es aber auch möglich, auf die Anordnung des Farbteilers 6 zu verzichten, wodurch sich ergibt, daß zwischen der Probe 9 und dem Okular 8 gegebenenfalls noch das Objektiv 7 angeordnet ist und dann der Emissionsfilter 60 störende Reflektionsstrahlungen der Anregungsstrahlung 1'' der Anregungslichtquelle 1 blockt. Erfindungsgemäß ist dabei in einer Variante vorgesehen, daß der Anregungslichtstrahl 1'' nicht den gleichen Weg läuft wie das Fluoreszenzspektrum 9', zum Beispiel wird in diesem Fall die Probe von der Seite oder von hinten angeleuchtet, dies hängt von dem jeweiligen Probenaufbau ab.

[0028] Die Verwendung des Objektives 7 bietet nicht nur eine Fokussierung des verhältnismäßig breiten Anregungslichtstrahles 1'' auf die Probe 9, sondern bietet umgekehrt natürlich auch eine Aufweitung des Abbildes des reflektierten Fluoreszenzspektrums 9' in einem ähnlich weiten Querschnitt, was der Ausleuchtung des Sehfeldes dient.

[0029] Für die Einkopplung der Anregungsstrahlung 1'' ist, wie beschrieben, der Farbteiler 6 vorgesehen. Die Ausgestaltung des Farbteilers 6 insbesondere als dichroitischer Farbteiler erlaubt, aufgrund der Materialeigenschaft des Farbteilers, unterschiedliche Eigenschaften des Farbteilers bei der Wellenlänge der Anregungsstrahlung und bei der Wellenlänge des Fluoreszenzspektrums. Bei der Wellenlänge der Anregungsstrahlung wird die Strahlung 1'' an der Oberfläche des Farbteilers reflektiert, bei der Wellenlänge der Emissionsstrahlung 9' der Probe läßt der Farbteiler die Strahlung unreflektiert transmittieren. Der Farbteiler erbringt daher nicht nur eine Aufteilung der verschiedenen Farben, sondern erlaubt auch gleichzeitig eine Reflexion

DE 101 23 439 A 1

5

der gewünschten ersten Wellenlänge bei Transmission der zweiten Wellenlänge. Dabei ist zu beachten, daß der Farbteiler, entsprechend der eingesetzten Wellenlänge des Lasers 10 und dem zu beobachtenden Fluoreszenzspektrums, optimierbar ist. Gegebenenfalls können geeignete Farbteiler in dem Fluoreszenzmikroskop ausgetauscht werden oder mit entsprechenden elektrischen oder pneumatischen usw. Hilfen ausgetauscht werden.

[0030] Gegebenenfalls kann auch ein zum Beispiel elektrisch aktivierbarer Farbteiler vorgesehen werden.

[0031] Das Lichtfeldaufweitungssystem 5 besteht je nach Anforderung aus einer oder mehreren Linsen mit oder ohne der Leuchtfeldblende 52. Für eine optimale Einkopplung der Strahlung 1' in das Mikroskop können die jeweiligen optischen Achsen der optischen Elemente zueinander bewegt werden sowie der Abstand variiert werden. Günstigerweise sind hierbei die Lichtelemente des Lichtfeldaufweitungssystems, also die Linsen 50, 51, sowie die Leuchtfeldblende 52 auf Schlitzen gelagert und zum Beispiel händisch oder automatisch einstellbar bzw. positionierbar.

[0032] In Fig. 4 ist eine ähnliche Anordnung wie in Fig. 1 gezeigt. Unterschiedlich gegenüber Fig. 1 ist, daß der Laser 10 der Anregungslichtquelle 1 nicht unmittelbar mit dem Lichtfeldaufweitungssystem 5 verbunden ist, sondern daß eine Faseroptik 4 zwischengeschaltet ist. Diese Faseroptik 4 besteht aus einer Eingangslinse 40, einem (hinlänglich bekannten) Lichtleiter 41 und einer Ausgangslinse 42, die in dem hier gezeigten Ausführungsbeispiel auch Teil des Lichtfeldaufweitungssystems 5 sein kann. Die Verwendung einer Faseroptik für die Einkopplung der Anregungsstrahlung 1' in das Fluoreszenzmikroskop bietet verschiedene Vorteile. Es wird eine homogene Ausleuchtung des Strahlquerschnittes 1" erreicht, wobei gleichzeitig Speckel und/oder Indifferenzen vermieden werden.

[0033] Erfindungsgemäß wird dabei vorgeschlagen, daß für die Führung der Laserstrahlung von der Anregungslichtquelle zumindest auf einem Teil des optischen Weges eine Faseroptik 4 vorgesehen ist. Das bedeutet, daß sehr wohl auch eine normale Übertragung der Strahlung im Medium Luft erfindungsgemäß gewollt ist, die Anordnung aber erlaubt, daß zum Beispiel eine platzsparende Anordnung realisierbar ist, insbesondere da der Lichtleiter 41 auch gebogen werden kann (in bestimmten Radien), ohne dabei merkliche Intensität zu verlieren. Hieraus resultiert auch eine kompakte Realisierung des erfindungsgemäßen Fluoreszenzmikroskops.

[0034] In Fig. 2, 3 sind noch verschiedene Konzepte für die Anordnung beziehungsweise Ausbildung der Anregungslichtquelle 1 gezeigt. Der Vorteil der Verwendung eines Lasers 10 besteht darin, daß eine sehr monochromatische Lichtquelle zur Verfügung steht. Sollen aber Proben mit verschiedenen Fluoreszenzspektren beobachtet werden, müßten verschiedene Wellenlängen zur Verfügung stehen. Das bedeutet, daß unterschiedliche Laser 10, 11, 12, 13, 14 (mit jeweils unterschiedlichen Wellenlängen) vorgesehen sind, die in geschickter Weise optisch zusammenzukoppeln sind, damit der resultierende Anregungslichtstrahl 1', wie zum Beispiel in Fig. 1 oder in Fig. 4 gezeigt, in das Fluoreszenzmikroskop eingekoppelt werden kann.

[0035] In Fig. 2 sind die verschiedenen Laser 10, 11, 12, 13, 14 im Wesentlichen parallel nebeneinander orientiert, derart, daß die Strahlachsen parallel zueinander orientiert sind. Die aus den Lasern 10 bis 14 austretenden Anregungsstrahlen 10', 11', 12', 13', 14' sind dabei zum Beispiel von verschiedenen Wellenlängen. Die verschiedenen Strahlen 10' bis 14' werden über mehrere Farbteiler 30, 31, 32, 33 umgelenkt, wobei die Strahlteile 30 bis 33 wiederum dichroisch ausgebildet sein können, das bedeutet, sie reflektieren die

6

aus dem Strahler emittierte Wellenlänge und transmittieren die andere, von hinten auflaufende Strahlung. Je nach Wahl der verschiedenen Farbteiler 30 bis 33 ergibt sich die Reihenfolge der Anordnung der Laser beziehungsweise die Anordnung der Laser mit den verschiedenen Wellenlängen. Die Verwendung eines aufwendigen Farbteilers ist bei dem letzten Laser 14 nicht notwendig, da es hier nur um eine ordentliche Umlenkung des Laserstrahles 14' geht, wofür zum Beispiel ein Umlenkspiegel 24 dient. Für eine ordentliche, hochgenaue Abstimmung des optischen Systems sind im optischen Weg entweder der Anregungslichtquelle 1 und/oder des gesamten Fluoreszenzmikroskops ein oder mehrere Justierspiegel oder Justierlinse/n vorgesehen.

[0036] Die Gesamtheit der bei Fig. 2 beziehungsweise Fig. 3 angeordneten Strahlteiler 30 bis 33 beziehungsweise Umlenkspiegel 21 bis 24 wird dabei in einer Strahlzusammenführungsoptik 2 realisiert. Diese ist entsprechend den eingesetzten Wellenlängen optimiert ausgebildet und gibt am Ende eine Strahlung 1' ab, die aus einer Mehrzahl möglichst monochromatischer Linien besteht. Für einen automatischen Betrieb des Fluoreszenzmikroskops ist auch vorgesehen, daß die Intensität der Laser 10 bis 14 bei Bedarf verändert werden kann, wobei zum Beispiel eine elektrische oder elektronische Regelung vorgesehen ist, oder aber Graukeile in den Strahlgang 10', 11', 12', 13' oder 14' gestellt werden können, um eine entsprechende Schwächung der Intensität der jeweiligen Laserstrahlung zu erreichen. Eine solche Steuerung der Intensität der verschiedenen Laserstrahlen kann dabei mit Hilfe von elektrischen Stellgliedern erfolgen oder händisch.

[0037] In einem Ausführungsbeispiel nach Fig. 3 ist eine Anregungslichtquelle 1 gezeigt, bei welcher neben den verschiedenen Farbteilern 30 bis 33, die letztendlich ein Zusammenführen der verschiedenen Linien erlaubt, noch mehrere Umlenkspiegel 21, 22, 23 und 24 vorgesehen sind, die auch gleichzeitig eine Justiermöglichkeit erlauben. Wiederum sind die Laser 10 bis 14 im Wesentlichen parallel angeordnet, wobei durch die Umlenkspiegel 21 bis 24 zum Beispiel eine rechtwinklige Umlenkung der jeweiligen Laserstrahlen 10', 11', 12', 13' und 14' erfolgt. Die jeweiligen Laserstrahlen werden dann über die Farbteiler 30 bis 33 zu einem einheitlichen Anregungsstrahl 1' zusammengekoppelt und dann zum Beispiel entweder in die Faseroptik 4 eingekoppelt oder direkt auf das Lichtfeldaufweitungssystem 5 gegeben. Zur Umlenkung des die Anregungslichtquelle 1 verlassenden Strahls 1' ist endseitig zum Beispiel ein Umlenkspiegel 29 vorgesehen.

[0038] Je nach räumlicher Anordnung kann auch eine Mischform vorgesehen werden, zum Beispiel, daß drei Laser über Umlenkspiegel auf den Farbteiler gerichtet sind und die anderen drei Laser direkt auf den Farbteiler gerichtet sind. Eine entsprechende Anordnung ergibt sich aus den räumlichen Gegebenheiten.

[0039] Die jetzt mit der Anmeldung und später eingereichten Ansprüche sind Versuche zur Formulierung ohne Präjudiz für die Erzielung weitergehenden Schutzes.

[0040] Die in den abhängigen Ansprüchen angeführten Rückbeziehungen weisen auf die weitere Ausbildung des Gegenstandes des Hauptanspruches durch die Merkmale des jeweiligen Unteranspruches hin. Jedoch sind diese nicht als ein Verzicht auf die Erzielung eines selbständigen, gegenständlichen Schutzes für die Merkmale der rückbezogenen Unteransprüche zu verstehen.

[0041] Merkmale, die bislang nur in der Beschreibung offenbart wurden, können im Laufe des Verfahrens als von erfindungswesentlicher Bedeutung, zum Beispiel zur Abgrenzung vom Stand der Technik, beansprucht werden.

DE 101 23 439 A 1

7

Patentansprüche

1. Fluoreszenzmikroskop, bestehend aus einer Anregungslichtquelle, deren Strahlung auf eine Probe gerichtet, dessen Fluoreszenzspektrum über ein Okular abbildbar ist, dadurch gekennzeichnet, daß als Anregungslichtquelle (1) ein Laser (10) vorgesehen ist. 5
2. Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Anregungslichtquelle (1) mehrere Laser (11 bis 14) bei verschiedenen Wellenlängen vorgesehen sind. 10
3. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder beiden der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Strahlzusammenführungsoptik (2) für die Strahlung mehrerer Laser (11 bis 14) vorgesehen ist. 15
4. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in dem optischen Weg zwischen Laser (10) und Probe (9) ein zumindest teilreflektierender Farbteller (6) vorgesehen ist. 20
5. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in dem optischen Weg ein Lichtfeldaufweitungssystem (5) zur möglichst vollständigen Ausleuchtung des Sehfeldes vorgesehen ist. 25
6. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Lichtfeldaufweitungssystem (5) eine Linse (50, 51) und/oder mindestens eine Leuchtfeldblende (52) vorgesehen sind. 30
7. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlung des Lasers (10) durch ein Objektiv (7) auf die Probe (9) fokussiert wird. 35
8. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das von der Probe (9) emittierte Fluoreszenzspektrum (9') den Farbteller (6) in Richtung des Okulars (8) durchdringt. 40
9. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Probe (9) und Okular (8) Emissionsfilter (60), insbesondere in Strahlrichtung des Fluoreszenzspektrums (9') nach dem Farbteller (6) vorgesehen ist. 45
10. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlzusammenführungsoptik (2) durch mehrere Strahlteiler und/oder Farbteller (30 bis 33) und/oder Umlenkspiegel (21 bis 24) gebildet ist. 50
11. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Laser (10) ein laserdiodengepumpter Festkörperlaser, ein laserdiodengepumpter Festkörperlaser mit Frequenzverdopplung beziehungsweise Frequenzvervielfachung oder mit gemischter Frequenzvervielfachung, Laserdioden, ein Gaslaser oder Free-Elektron-Laser vorgesehen ist. 55
12. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß für die Führung des Laserstrahls (1') von der Anregungslichtquelle (1) zur Probe (9), zumindest auf einem Teil des optischen Weges, eine Faseroptik (4) vorgesehen ist. 60
13. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Intensität der Laser (10) beziehungsweise des Laserstrahls (1') veränderlich und einstellbar ist. 65

8

14. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlung des Fluoreszenzspektrums (9') von dem Objektiv (7) abgebildet und gegebenenfalls aufgeweitet wird.

15. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in dem optischen Weg Justierspiegel vorgesehen sind.

16. Fluoreszenzmikroskop nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Wellenlänge des Laserlichtes der Anregungslichtquelle (1) veränderlich und einstellbar ist.

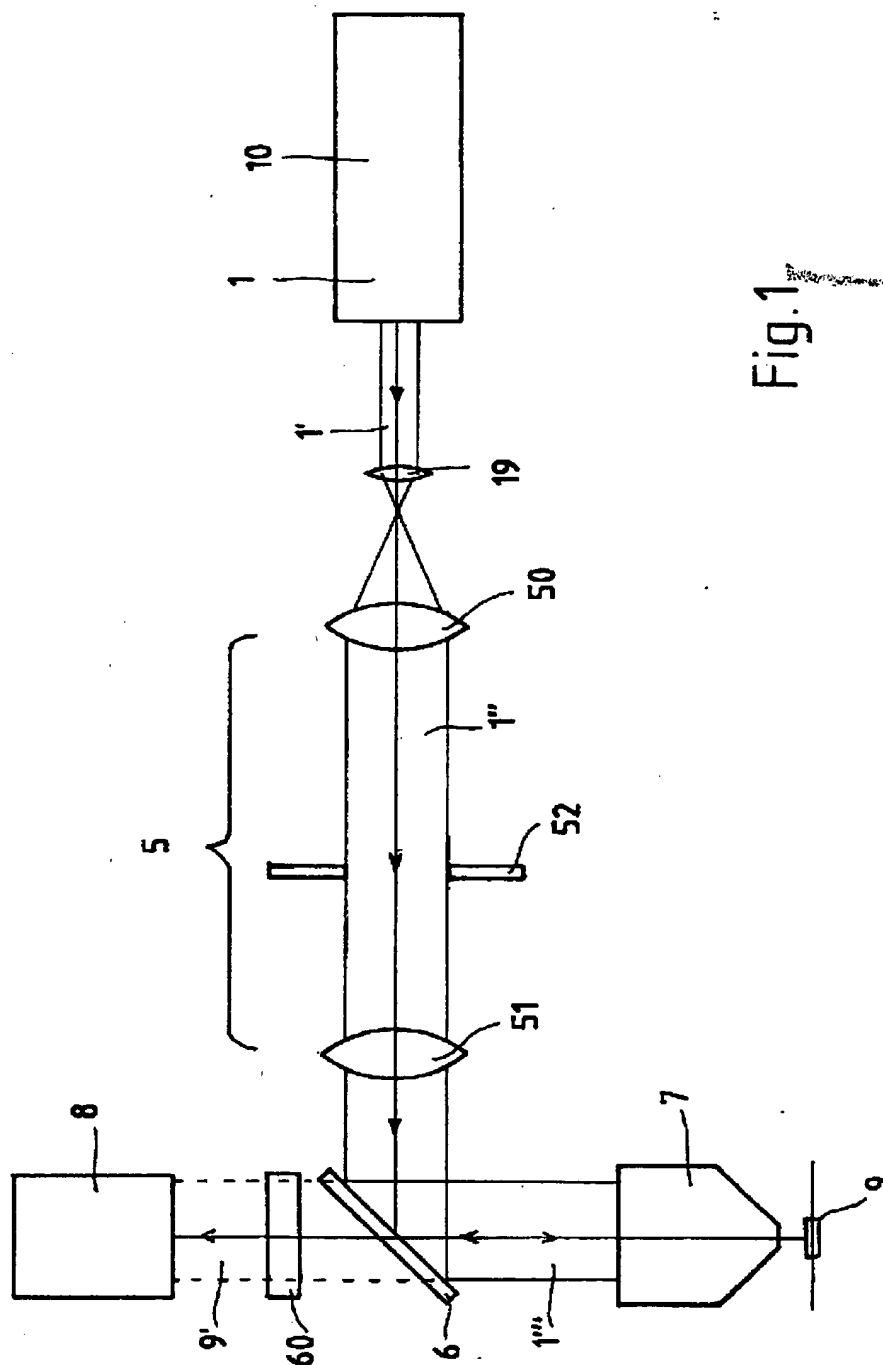
Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:
Int. Cl.7:
Offenlegungstag:

DE 101 23 439 A1
G 02 B 21/16
21. November 2002



ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:
Int. Cl. 7:
Offenlegungstag:

DE 101 23 439 A1
G 02 B 21/16
21. November 2002

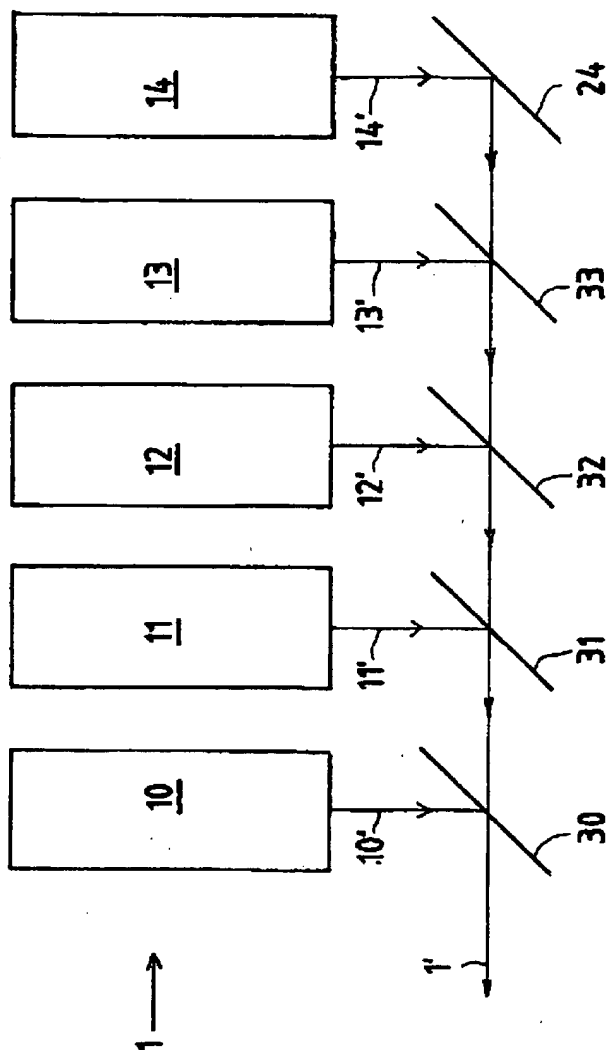


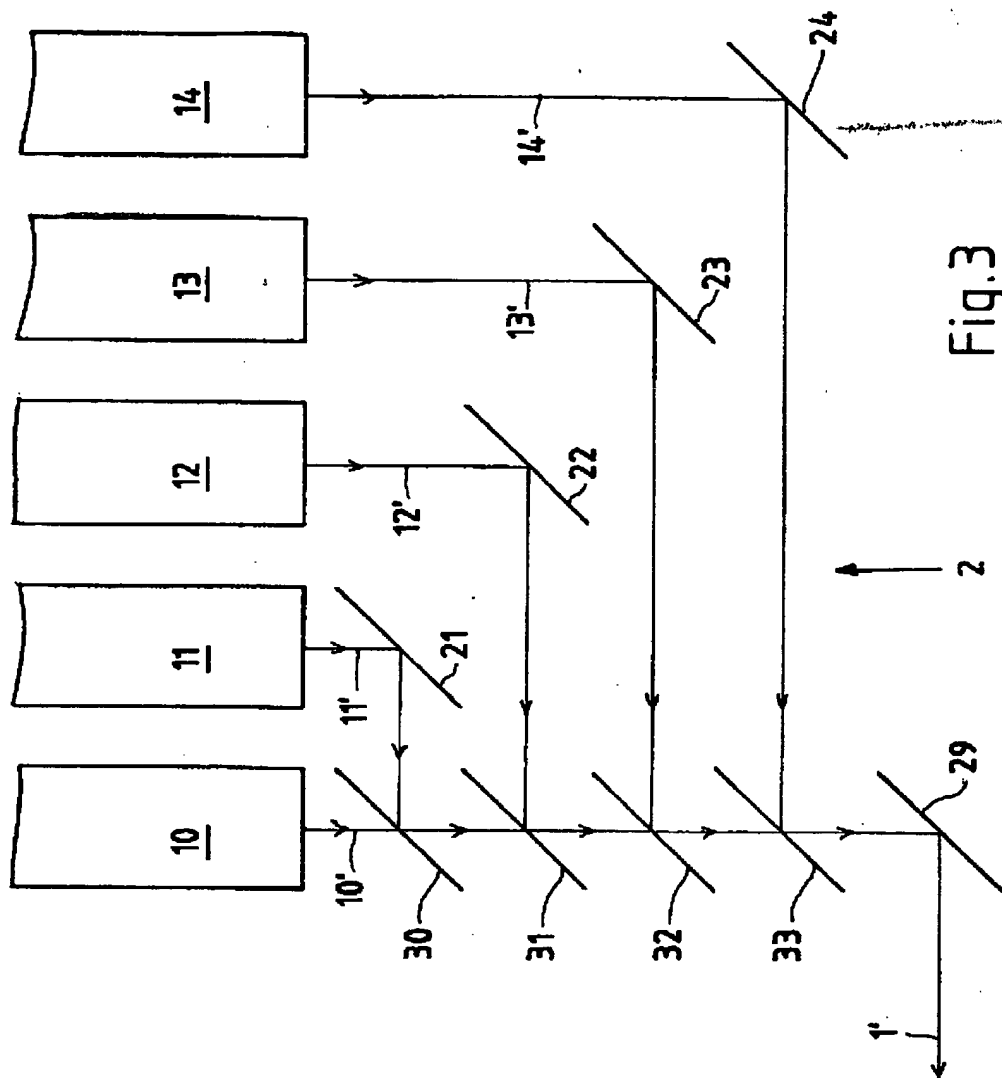
Fig. 2

102 470/380

ZEICHNUNGEN SEITE 3

Nummer:
Int. Cl. 7:
Offenlegungstag:

DE 101 23 439 A1
G 02 B 21/16
21. November 2002

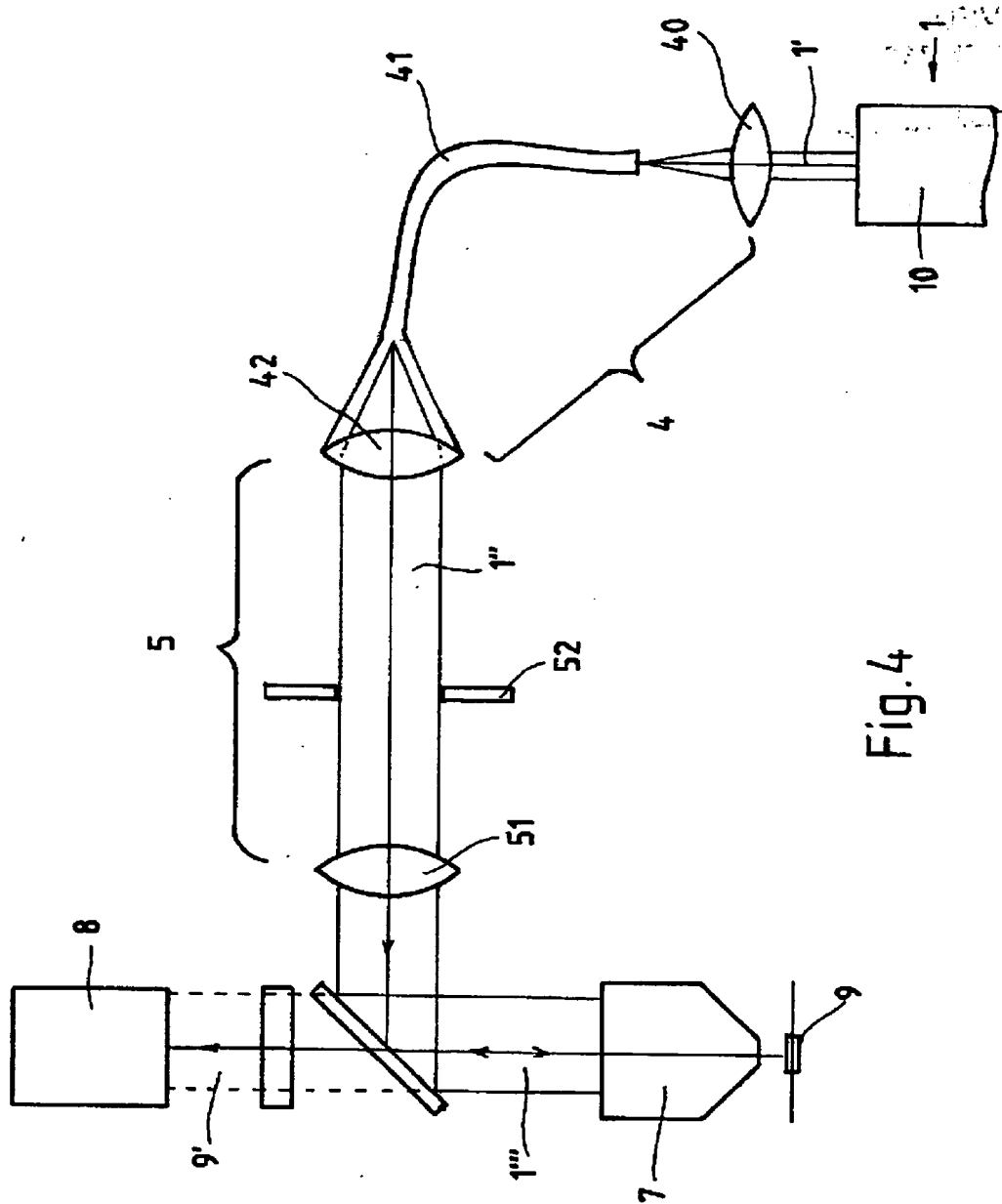


102 470/380

ZEICHNUNGEN SEITE 4

Nummer:
Int. Cl. 7:
Offenlegungstag:

DE 101 23 439 A1
G 02 B 21/16
21. November 2002



102 470/380